

ARTIGO DE REVISÃO

REVIEW ARTICLE

Células T Regulatórias Naturais (T_{REGS}) em Doenças Reumáticas*Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases*

Wilson de Melo Cruvinel⁽¹⁾, Danilo Mesquita Jr.⁽²⁾, Júlio Antônio Pereira Araújo⁽²⁾,
Karina Carvalho Salmazi⁽³⁾, Esper Georges Kállas⁽³⁾, Luis Eduardo Coelho Andrade⁽⁴⁾

RESUMO

O sistema imune sadio deve manter o balanço entre a capacidade de responder a agentes infecciosos e de sustentar a autotolerância. A ausência de resposta adequada submete o indivíduo aos efeitos deletérios da invasão por patógenos, ao passo que o sistema respondendo de modo exacerbado pode gerar respostas inflamatórias prejudiciais. Acreditava-se que os mecanismos de deleção clonal e anergia fossem os mecanismos essenciais no controle de clones de linfócitos T auto-reativos. Apesar das evidências funcionais a favor da existência de células T supressoras, por muitos anos a imunologia falhou em identificar suas características fenotípicas e confirmar sua existência, motivo pelo qual o tema passou por longo período de descrédito. A recente demonstração de diferentes fenótipos de células, agora chamadas células T regulatórias, reintroduziu o paradigma de que a auto-reatividade é ativamente regulada também por subtipos particulares de linfócitos. Este tema é de grande interesse contemporâneo e a literatura está repleta de estudos descrevendo novos subtipos de células regulatórias, bem como a função, o fenótipo e a frequência em condições fisiológicas e patológicas. Nesse universo, destaca-se o subtipo mais importante de células com função imunorregulatória, conhecido como células T regulatórias naturais (T_{REGS}). Representando cerca de 5% dos linfócitos T CD4 do sangue periférico, são células caracterizadas pela expressão constitutiva das moléculas FOXP3, GITR, CTLA-4 e altos níveis de CD25. As alterações deletérias nesta população resultam o desencadeamento de doenças auto-imunes em camundongos, muito semelhantes às doenças auto-imunes humanas. A presente revisão aborda os conhecimentos básicos sobre as T_{REGS} e seu estudo em doenças reumáticas de classificação auto-imune, abrindo perspectivas para o entendimento dos mecanismos de regulação periférica e sobre a fisiopatologia dessas enfermidades. Apresenta, ainda, a perspectiva de futuras abordagens terapêuticas fundamentadas na manipulação dessas células.

Palavras-chave: células T regulatórias, T_{REGS}, CD4⁺CD25⁺, Foxp3, doenças auto-imunes, tolerância imunológica.

ABSTRACT

The healthy immune system must keep the delicate balance between the capacity to respond to exogenous antigens and to keep the tolerance to endogenous antigens. In the absence of an adequate response to exogenous agents the individual is subjected to the deleterious effect of the invasion for pathogens. On the other hand, if the immune system responds in an unwary exacerbated way harmful inflammatory consequences may result. Well-established mechanisms of maintaining self-tolerance include clonal deletion and anergy. Despite the functional evidence in favor of the existence of suppressor T cells, for many years immunologists failed to identify the phenotypic characteristics and to confirm the existence of these lymphocytes. The recent demonstration of different phenotypes of cells, now designated regulatory T cells, reintroduced the paradigm of active regulation of auto-reactivity by particular subtypes of lymphocytes. This subject is of great interest in the contemporary literature. It has been shown that excess regulatory function may be associated with increased susceptibility to infectious and neoplastic diseases. On the other hand decreased regulatory function may cause autoimmunity. In fact, several experimental models of diverse autoimmune conditions have been developed by decreasing or abolishing regulatory T cells. Counterpart of this phenomenon has been sought for in several human autoimmune diseases. At this moment it seems that the most important subtype of regulatory cells are the natural regulatory T cells (TREGS), which represent about 5% of peripheral blood CD4 T lymphocytes. These cells are characterized by the constitutive expression of FOXP3, GITR, CTLA-4 and high levels of CD25. The present article reviews the basic knowledge on the TREGS and the several studies describing the status and function of these cells in autoimmune rheumatic diseases.

Keywords: regulatory T cells, TREGS, CD4⁺CD25⁺Foxp3, autoimmune disease, immunologic tolerance.

Recebido em 14/7/2008. Aprovado, após revisão, em 31/11/2008. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

1. Doutorando pela disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e professor-assistente de Imunologia dos cursos de Medicina e Biomedicina da Universidade Católica de Goiás.

2. Mestrando pela disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

3. Divisão de Doenças Infecciosas da Unifesp, Departamento de Alergia e Imunologia da Universidade de São Paulo (USP).

4. Professor-associado da disciplina de Reumatologia da Unifesp e assessor médico do Setor de Imunologia Fleury Medicina Diagnóstica.

Endereço para correspondência: Luis Eduardo Coelho Andrade, Disciplina de Reumatologia da Unifesp, Rua Botucatu, 740, 3º andar, 04023-069, São Paulo, SP, e-mail: luis.andrade@unifesp.br

INTRODUÇÃO

Cada vez mais se acumulam evidências de que o sistema imunitário é constituído por uma rede complexa e articulado por inúmeros componentes integrados. Podem-se citar as células com seus diversos receptores, mediadores secretados, moléculas expressas, vias bioquímicas acionadas, entre outros componentes que, em conjunto e em diferentes sítios anatômicos, dotam o organismo da capacidade de interagir com os diferentes estímulos antigênicos⁽¹⁾. Geralmente, as respostas são iniciadas mediante a interação dos antígenos exógenos com células apresentadoras de antígenos, estrategicamente posicionadas e responsáveis por captação, transporte e processamento antigênico. Uma vez processados, os peptídeos são, então, apresentados para os componentes da resposta imune específica ou adquirida, que, em sendo ativados, desencadeiam resposta efetora contra o estímulo antigênico. Muitas vezes, a estratégia de defesa adquirida torna-se permanente (memória imunológica), assegurando maior conforto e eficiência ao organismo nas exposições posteriores e tendem, na maioria das vezes, à busca pelo equilíbrio homeostático⁽²⁾.

Ao longo dos anos, o ambiente apresentará infinidade de fontes antigênicas potenciais e somente um sistema imunitário altamente flexível e adaptável é capaz de distinguir e responder às diversas seqüências antigênicas encontradas. A base de reconhecimento deste sistema é o produto das recombinações aleatórias de segmentos gênicos que geram linfócitos com enorme diversidade de receptores. Diretamente vinculada à resposta aos diferentes antígenos encontra-se a habilidade de regulação, mecanismo responsável por assegurar que as respostas não atinjam amplitudes patológicas, e por impedir que o sistema seja ativado indevidamente contra antígenos próprios, gerando desordens auto-imunes. Para desempenhar função protetora adequada, os múltiplos clones de células T com ampla diversidade de reconhecimento antigênico passam por rigoroso processo de seleção e maturação tímica que se dá mediante o reconhecimento de peptídeos próprios ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC)⁽³⁾.

A capacidade de distinção entre antígenos próprios e não-próprios é definida como tolerância imunológica e é fundamental para evitar o auto-reconhecimento de modo intenso, que ocasionaria respostas auto-imunes patológicas. Portanto, timócitos auto-reativos que reconhecem antígenos próprios com elevada afinidade são eliminados por deleção clonal no timo⁽³⁾. Mesmo sendo este um mecanismo eficien-

te, é sabido que algumas células auto-reativas conseguem evadir esta barreira, saindo do timo e podendo ser ativadas na periferia com potencial de gerar auto-imunidade. O fato de que células auto-reativas possam ser detectadas na periferia demonstra, claramente, que o mecanismo de seleção tímica, responsável pela eliminação dos clones de células T auto-reativas, é incompleto⁽⁴⁾. A questão é: como o sistema irá assegurar que tais células auto-reativas não serão reativadas, promovendo a quebra na tolerância e tão logo o surgimento de enfermidades auto-imunes? Em outras palavras o sistema imunitário necessita de diferentes e redundantes recursos que assegurem que potenciais respostas auto-imunes não ocorram. A Figura 1 resume o mecanismo de maturação e diferenciação das células T, bem como a geração e o escape dos clones auto-reativos para a periferia.

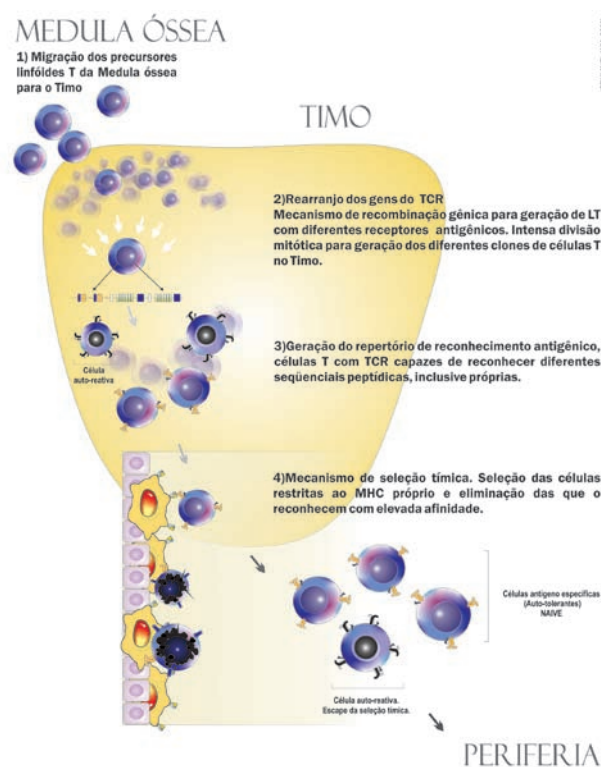


Figura 1 – Migração dos precursores do LT da Médula óssea para o Timo e a maturação do LT. Rearranjos no córtex tímico para geração do TCR, evento que gera além das células específicas para o antígenos exógenos, clones auto-reativos. Esquema do mecanismo de tolerância central para eliminação das células auto-reativas. A falha na tolerância central permite a saída para a periferia de células auto-reativas que serão controladas pelo mecanismos da tolerância periférica, entre as células T Regulatórias.

Várias são as estratégias e os mecanismos utilizados com a finalidade de regular a auto-imunidade. Além da seleção

negativa, que ocorre nos estágios iniciais de maturação celular em que células auto-reativas detectadas são eliminadas, acontece também, na periferia, o mecanismo de tolerância periférica, em que células maduras reativas sofrem anergia (quando não recebem o sinal co-estimulatório) ou são moduladas pelos mecanismos de supressão. Entre os mecanismos de tolerância periférica existem várias populações celulares específicas com função regulatória, definidas em conjunto como células imunorregulatórias. É possível que as enfermidades auto-imunes possam estar associadas à falha na eliminação ou na inativação de clones de células auto-reativas de alta afinidade, durante sua ontogenia, podendo também haver ou não falha do sistema imune em controlar clones auto-reativos de afinidade intermediária, que escaparam para a periferia⁽⁵⁾. Nesse contexto, as células com função regulatória são fundamentais, sendo também importantes na modulação dos processos de eliminação de patógenos e antígenos tumorais. Esses mecanismos ocorrem com destruição de tecidos próprios, exposição de auto-antígenos e produção de citocinas pró-inflamatórias, condições estas que, se não reguladas, favorecem a indução e a manutenção dos eventos auto-imunes.

Para exercerem sua função, as células imunorregulatórias apresentam, como propriedades básicas, a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , além da capacidade de indução de supressão mediada por contato célula-célula. Atuam em uma complexa rede de mecanismos regulatórios destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas diante dos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, aloantígenos, auto-antígenos e alérgenos. Entre as células T várias subpopulações apresentam propriedades regulatórias, como as células T_{RI} , produtoras de IL-10, que suprimem algumas respostas de células T *in vivo*^(6,7), as células TH3, capazes de suprimir mediante a produção de TGF- β ^(8,9), além dos linfócitos T $CD8^+CD28^-$ ($CD8^+ T_R$), células NK/T, células T $\gamma\delta$ ⁽¹⁰⁻¹²⁾, linfócitos T duplo-negativos ($CD4^-CD8^-$) e linfócitos T $CD8^+Qa1^+$ ⁽¹³⁾. Além das células T, outros subtipos celulares foram descritos com tais propriedades. Entre eles as células B $CD1^+$, produtoras de IL-10⁽¹⁴⁾. As principais células regulatórias e suas funções podem ser observadas na Figura 2.

De modo particular, entre as células T com função imunorregulatória, tem havido grande destaque para as células T_{REGS} de ocorrência natural ($T_{REGS} CD4^+CD25^+$), descritas por Sakaguchi *et al.*⁽¹⁵⁾, as quais são potencialmente capazes de suprimir a ativação, a proliferação e/ou a função efetora dos linfócitos T $CD4^+$, T $CD8^+$ e, possivelmente, células

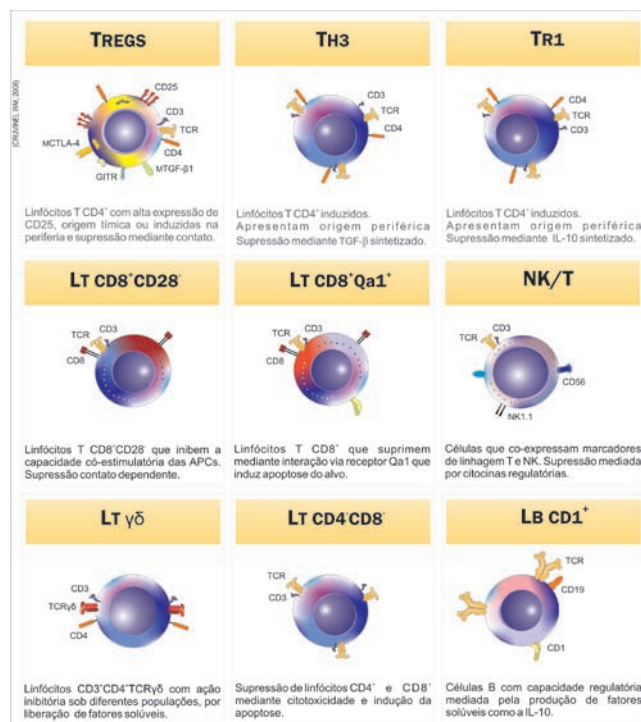


Figura 2 – Características básicas das principais células com função regulatória.

NK, NK/T, linfócitos B e células dendríticas⁽¹⁶⁾. São indispensáveis para a manutenção dos mecanismos de tolerância e o seu conhecimento é fundamental para a compreensão da fisiopatogenia das enfermidades auto-imunes e para subsidiar as estratégias de interferência nos mecanismos de recuperação da tolerância nessas patologias. A presente revisão aborda os conhecimentos básicos sobre as T_{REGS} , o seu estudo em diferentes doenças reumáticas e as perspectivas de evolução no tratamento das doenças auto-imunes por meio da manipulação dessas células.

CÉLULAS T REGULATÓRIAS ($CD4^+CD25^+$) DE OCORRÊNCIA NATURAL – T_{REGS}

As células T_{REGS} de ocorrência natural estão relacionadas com a manutenção da autotolerância e são de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imunitário⁽¹⁷⁾. São comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos nos tecidos periféricos⁽¹⁸⁻²⁰⁾ e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e auto-antígenos.

Atualmente, as T_{REGS} são alvos de intensas pesquisas que especulam sua função como reguladoras das respostas imunes fisiológicas e sua participação em diversas enfermidades,

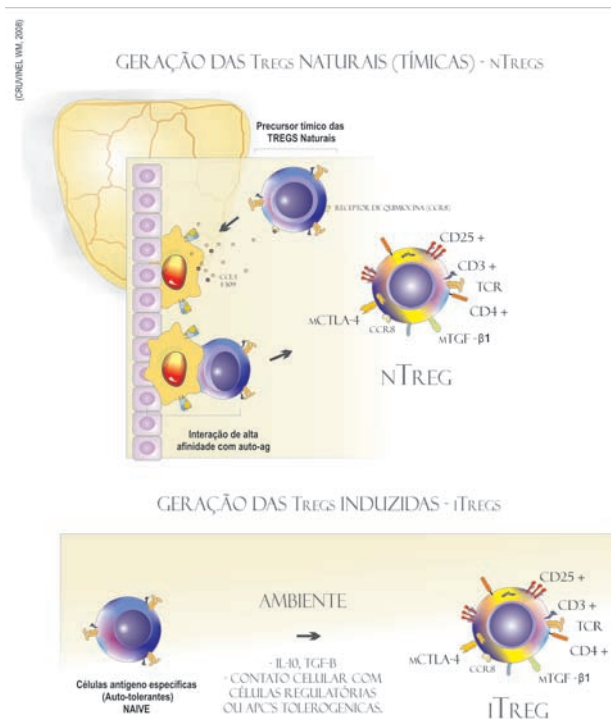
como doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas, auto-imunes e no campo da imunologia dos transplantes⁽²¹⁻²³⁾. Em cada grupo nosológico, essas células são avaliadas com o propósito de mais bem se entender os mecanismos imunopatogênicos das doenças e de se abrirem perspectivas terapêuticas imunorregulatórias. Assim, espera-se alcançar nível de compreensão e controle da resposta imune que permita diferentes abordagens, por exemplo, estimular a função dessas células em doenças que cursem com a exacerbação da resposta imune, como no caso das doenças auto-imunes, doenças alérgicas e rejeição aos transplantes, ou, ainda, inibir sua ação nas neoplasias e doenças infecciosas, as quais se deseja resposta imune mais vigorosa⁽²⁴⁾.

ORIGEM DAS CÉLULAS T_{REGS} (CD4⁺CD25⁺) DE OCORRÊNCIA NATURAL

As primeiras descrições de células especializadas na regulação da resposta imune ocorreram no início da década de 1970, quando foi relatado que algumas células T eram capazes de suprimir o desenvolvimento de doenças auto-imunes⁽²⁵⁾. Posteriormente, Sakaguchi *et al.*⁽¹⁵⁾ descreveram as células T_{REGS} como linfócitos T CD4⁺ que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) e são responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças auto-imunes em camundongos. Isso ficou comprovado a partir de evidências experimentais de seu papel imunorregulatório, uma vez que a eliminação de esplenócitos CD25⁺ em roedores normais induzia distúrbios auto-imunes, como tireoidite, insulinite, poliartrite, glomerulonefrite e doença do enxerto *versus* hospedeiro. Foi demonstrado, ainda, que a transferência adotiva dessa população inibia a auto-imunidade em modelos experimentais^(15,26).

O interesse no estudo das T_{REGS} deve-se à função-chave dessa população celular na manutenção dos mecanismos de autotolerância e na regulação da resposta imune⁽²⁰⁾. As T_{REGS} representam 5% a 10% do total de células CD4⁺ no sangue periférico⁽²⁷⁾. Há evidências de que os timócitos CD4⁺CD25⁺ são selecionados no timo a partir de interações com peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC-II⁽²⁸⁾ e que a seleção positiva dessas células depende de interações de alta afinidade com auto-antígenos expressos em moléculas de MHC⁽²⁹⁾. Ainda é controverso o mecanismo pelo qual as T_{REGS} escapam à seleção negativa, mas acredita-se que estas, uma vez selecionadas positivamente por meio de reconhecimento de alta afinidade de peptídeos próprios, produzam moléculas anti-apoptóticas que as protegem da seleção negativa⁽³⁰⁾. As T_{REGS}, além da

geração tímica, podem ser induzidas na periferia por ação de fatores solúveis específicos sobre células *naive* recém-egressas do timo. As duas vias de geração de T_{REGS} estão ilustradas na Figura 3.



nT_{REGS}: células T regulatórias naturais; iT_{REGS}: células T regulatórias induzidas;
APC's: células apresentadoras de antígenos.

Figura 3 – Origem das células T Regulatórias. As T_{REGS} tímicas são originadas a partir de precursores específicos mediante interações de alta afinidade com auto-antígenos e atraídas por quimiocinas secretadas pelos macrófagos da medula tímica e pelas células epiteliais do septo fibroso (Quadro superior). As T_{REGS} podem ser induzidas na periferia a partir dos linfócitos T *naive* recém selecionados mediante contatos com citocinas imunomodulatórias (IL-10, TGF- β) ou a partir de interações com células regulatórias ou APC's tolerogênicas (Quadro inferior). Tanto nT_{REGS} quanto iT_{REGS} apresentam as mesmas características fenotípicas e funcionais.

Annunziato *et al.*⁽³¹⁾ avaliaram as características fenotípicas e funcionais dos timócitos humanos residentes no septo fibroso e na medula tímica e demonstraram que essas células respondem a quimiocinas produzidas por macrófagos e células epiteliais tímicas residentes, expressam CD4⁺, CD25⁺, mTGF- β 1 e CTLA-4 de membrana, além de apresentar baixa produção de IL-10 e nenhuma de IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ . Encontraram, também, que a atividade supressora foi contato-dependente e se fazia mediante a habilidade de inibir a expressão da cadeia α do receptor da IL-2 nas células-alvo.

Além do timo, as T_{REGS} humanas foram isoladas em outros sítios anatômicos, como nos órgãos linfóides secundários, por exemplo, tonsilas e baço⁽³²⁾, além de sangue de cordão umbilical⁽³³⁾. Ademais, sabe-se que as T_{REGS} presentes no timo são células *naïve* e que se tornam ativadas, adquirindo fenótipo de memória, quando saem para a periferia⁽³³⁾.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CÉLULAS T_{REGS} ($CD4^+CD25^+$) DE OCORRÊNCIA NATURAL

Estudos iniciais caracterizavam fenotipicamente as T_{REGS} com base apenas na expressão constitutiva dos marcadores CD4 e CD25, embora seja conhecido que qualquer outra célula T $CD4^+CD25^-$ possa, uma vez ativada, expressar transitoriamente a molécula CD25^(15,20). Em humanos, as células T $CD4^+$ apresentam diferentes intensidades de expressão do receptor CD25. É possível se observar, dentro da população $CD4^+CD25^+$, uma população mais abundante, expressando baixos níveis de CD25, e uma população menos numerosa, com elevada intensidade de expressão desse receptor^(27,34). Esta última população, com intensa expressão de CD25, corresponde ao *pool* de T_{REGS} . Não obstante a limitação do receptor CD25 como marcador fenotípico de T_{REGS} ⁽²⁰⁾, a estratégia atual para isolamento e caracterização das T_{REGS} fundamenta-se no reconhecimento dele. O CD25 representa, ainda, na fisiologia dessa célula, componente indispensável para sua geração e manutenção no organismo⁽²⁰⁾. Do ponto de vista molecular, Hori, Nomura e Sakaguchi⁽³⁵⁾ demonstraram que o fator de transcrição *Foxp3* é predominantemente expresso nas T_{REGS} tímicas e periféricas. Células T *naïve* transfectadas com o mRNA do gene *Foxp3* adquirem característica de células regulatórias tornando-se anérgicas e supressoras *in vitro*. Foi observado, ainda, que as células transfectadas adquiriram fenótipo semelhante ao das T_{REGS} em relação à expressão fenotípica e à produção de citocinas e outras moléculas relacionadas às T_{REGS} , como CD25, CTLA-4, CD103 e GITR. Passaram também a apresentar capacidade de suprimir a proliferação de outras células T e de inibir o desenvolvimento de doença auto-imune e doença inflamatória dos vasos *in vivo*^(35,36). Os autores relataram, ainda, que o número de células $CD4^+CD25^+$ encontra-se aumentado em camundongos transgênicos para *Foxp3* e que camundongos deficientes para esse gene apresentam hiperativação das células T⁽³⁶⁾.

Dessa forma, *Foxp3* parece ser um gene de grande importância no desenvolvimento e na função das T_{REGS} , tanto em camundongos quanto em humanos. Têm sido

descritos pacientes com mutação no gene *FOXP3*, que apresentam a síndrome denominada IPEX (desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia, síndrome ligada ao X). Esta condição consiste de um distúrbio auto-imune que afeta múltiplos órgãos com desenvolvimento de alergia e doença inflamatória dos vasos⁽³⁴⁾. Aparentemente, esses pacientes têm comprometimento no desenvolvimento das T_{REGS} e conseqüente defeito na função supressiva, sendo induzido estado de hiperativação das células T, que se tornam reativas contra auto-antígenos, bactérias comensais do intestino ou antígenos ambientais inócuos⁽²⁰⁾. A maioria das células T que expressa *Foxp3* é de células T $CD4^+$ (> 97%) e essa população de células T $CD4^+$ supressoras ainda pode ser dividida em $T_{CD4^+CD25^{hi}}$ e $T_{CD4^+CD25^{low}}$, ou seja, células com alta expressão de CD25 e células com baixa expressão de CD25. Ensaios *in vitro* revelaram que tanto as células $T_{CD4^+CD25^{hi}} Foxp3^+$ quanto as células $T_{CD4^+CD25^{low}} Foxp3^+$ suprimem a proliferação de células T respondedoras com igual potência.

Recentemente, foi demonstrado por Seddiki *et al.*⁽³⁷⁾ que a avaliação da molécula CD127 pode funcionar como opção excelente para obtenção de uma população de T_{REGS} com alto grau de pureza e com alto grau de atividade supressora⁽³⁷⁾. Estudos anteriores já relatavam que a expressão do *Foxp3* nem sempre se correlacionava com a expressão da molécula CD25⁽³⁸⁾. Liu *et al.*⁽³⁹⁾ observaram que a maioria das células $CD4^+Foxp3^+$ era do subtipo $CD25^{high}CD127^{low}$. No entanto, alguns indivíduos apresentam porcentagem significativa de células *Foxp3* positivas com fenótipo $CD25^+CD127^{low}$ ou $CD25^{low}CD127^{low}$. Este estudo demonstrou que a utilização do CD25 em conjunto com o CD127 poderia fornecer resultados bem mais fidedignos para análise de uma população de T_{REGS} , com maior grau de pureza, e que a combinação desses dois marcadores identifica a população de T_{REGS} no sangue periférico em um número significativamente maior do que se pensava cerca de 7% a 8% das células T $CD4^+$. Foi observado, também, que, por meio da utilização do CD127, pode-se distinguir, de maneira mais clara, as células efectoras recém-ativadas e as células de memória da população de T_{REGS} , pois apenas as T_{REGS} recém-ativadas apresentam constitutivamente baixa expressão de CD127, enquanto as células de memória apresentam alta expressão desse marcador e as células efectoras tradicionais rapidamente voltam a expressar este marcador após a ativação^(37,39).

Imunofenotipicamente, o método mais aceito hoje em dia para se alcançar o isolamento mais puro e homogêneo das T_{REGS} é obtido a partir da marcação para células

CD4⁺CD25^{HIGH}CD127⁻. O uso de outros marcadores, como GITR, CTLA-4, CD122, PD-1, OX40, entre outros, embora também expressos em condições de ativação, pode auxiliar na sua caracterização. A caracterização fenotípica das T_{REGS} está esquematizada na Figura 4.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS T_{REGS}

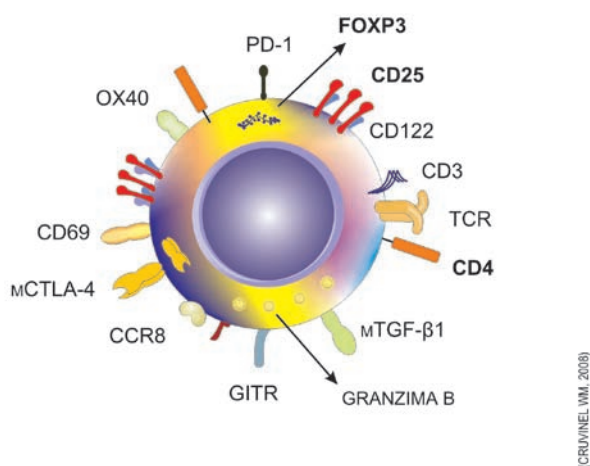


Figura 4 – As T_{REGS} representam em torno de 5% do total das células T CD4⁺ no sangue periférico e são encontradas em outros tecidos. Apresentam alta expressão da cadeia α do receptor da IL-2. Foram avaliadas inicialmente pela co-expressão dos receptores CD4 e CD25 sendo atualmente para sua identificação se faz necessária a pesquisa do transcrito primário, associada a baixa expressão de CD127.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DAS CÉLULAS T_{REGS} (CD4⁺CD25⁺) DE OCORRÊNCIA NATURAL

Para avaliação das características funcionais das T_{REGS}, tem sido analisado seu comportamento em estudos *in vitro*. Uma de suas características marcantes é a não-proliferação após estímulo via TCR com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28, ou por células apresentadoras de aloantígenos. O mesmo comportamento é observado quando são estimuladas repetidas vezes, comprovando suas características anérgicas⁽⁴⁰⁾. As propriedades inibitórias das T_{REGS} foram evidenciadas a partir da realização de co-cultivos entre T_{REGS} e células CD4⁺CD25⁻ na presença de estímulo policlonal, sendo as T_{REGS} diluídas normalmente em pequenas quantidades⁽⁴¹⁾. Esses estudos demonstraram também que a ação supressora das T_{REGS} sobre células T CD4⁺CD25⁻ ou CD8⁺ é dependente de contato célula-célula^(27,34,40).

O perfil de citocinas produzido por T_{REGS} recém-isoladas, ativadas por anti-CD3 ou por APC alogênica *in vitro*, registra baixos níveis de IFN- γ , TGF- β e IL-10, e

ausência de IL-2 e IL-4, o que é inteiramente distinto do observado em culturas de células T CD4⁺CD25⁻, em que se detectam níveis médios de IL-2, IL-10 e IFN- γ , e baixos de TGF- β ⁽³⁴⁾. Até o momento, não se tem comprovação da relevância das citocinas como indutores da supressão, pois o bloqueio das citocinas nas culturas (IL-4, IL-10, TGF- β) não inibe a supressão mediada pelas T_{REGS}⁽³⁴⁾. Sabe-se que a supressão é independente de IL-10, mas existem controvérsias quanto à participação do TGF- β ^(31,34). O que parece mais provável é que esta população celular possa exercer supressão das mais variadas formas, visto que, se uma via estiver impossibilitada de atuar, ou estiver defeituosa, as T_{REGS} utilizariam de via distinta e o efeito final seria o mesmo, ou seja, supressão imune. O meio no qual estão inseridas também é determinante, pois define como e se vão exercer imunorregulação, pois nem todas as células imunes poderão estar suscetíveis a sua ação.

Ao se transferir o sobrenadante de cultura de T_{REGS} para culturas de células CD4⁺CD25⁻ não se observa nenhum efeito na proliferação, sugerindo que a supressão não seja exclusivamente dependente de fatores solúveis liberados por elas⁽⁴²⁾. As evidências demonstram que as T_{REGS}, para exercer supressão sobre as células T, necessitam de ativação via TCR e de contato célula-célula⁽⁴³⁾.

A principal função das T_{REGS} é regular negativamente as respostas imunes. Elas são capazes de inibir várias células, tanto relacionadas à imunidade inata quanto à adaptativa⁽²⁸⁾. Segundo Thornton *et al.*⁽⁴⁴⁾, para exercerem sua função supressora, elas provavelmente necessitam de ativação via TCR e IL-2. O estudo de Pandiyan *et al.*⁽⁴⁵⁾ contribuiu para fortalecer a teoria já antiga a qual relatava que, uma vez que as T_{REGS} apresentam elevada expressão da cadeia α do receptor da IL-2, podem absorver a IL-2 autócrina, impedindo a ativação da célula-alvo. Eles identificaram novo mecanismo de ação das T_{REGS} por meio do consumo de IL-2 e outras citocinas de sobrevivência e crescimento celular como IL-7. O resultado dessa ação é a indução de apoptose na célula-alvo⁽⁴⁵⁾. Paust e Cantor⁽⁴⁶⁾ relataram que as T_{REGS} são capazes de regular negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86) em células dendríticas, reduzindo sua função de apresentação de antígeno. A interação do CTLA-4, expresso nas T_{REGS}, com o B7 de uma célula *naive* (CD4⁺CD25⁻) mostrou-se capaz de induzir a supressão à produção de IL-2 pela célula respondedora *naive* por meio da indução de via de sinalização intracelular que leva a produção do repressor precoce de cAMP induzível. A célula-alvo da supressão passa a expressar CTLA-4 de membrana e é capaz de propagar a supressão

para outras células vizinhas em um modelo de “tolerância infecciosa contato-dependente”⁽⁴⁷⁾. A Figura 5 fornece visão geral dos mecanismos de ação das T_{REGS} em diferentes alvos celulares.

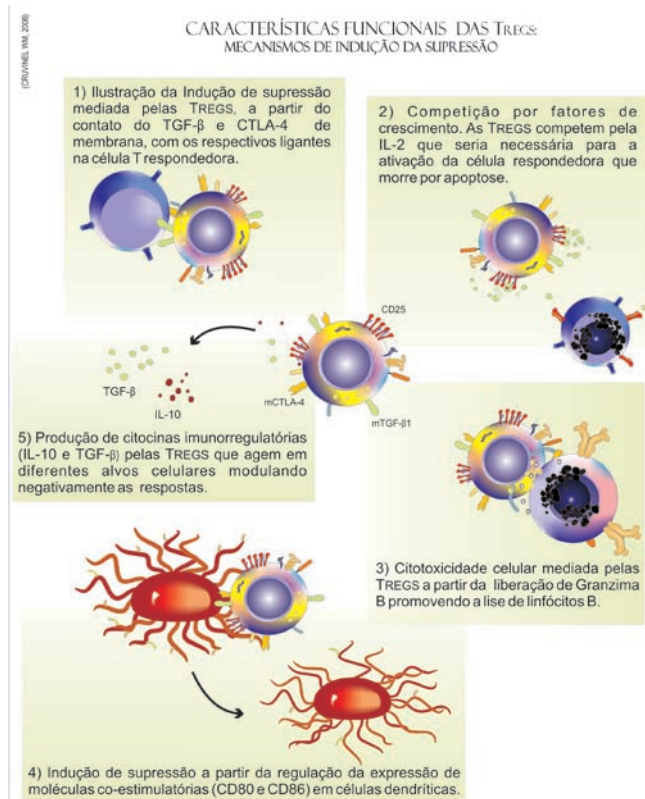


Figura 5 – Representação de algumas possibilidades de supressão induzida pelas T_{REGS} em diferentes situações e em diferentes alvos celulares.

CÉLULAS T_{REGS} NAS DOENÇAS REUMÁTICAS

Uma série de evidências vem sendo acumulada demonstrando que a quebra dos mecanismos de tolerância imune se inicia no timo com o escape de clones com potencial auto-reativo. Contudo, a progressão ou não para auto-imunidade será determinada de maneira crítica e relevante na periferia. Na maioria das vezes, os mecanismos de tolerância conseguem controlar a ativação periférica dos clones auto-reativos, que são eliminados ou anergizados. Quando esse controle é insuficiente, a doença auto-imune se manifesta.

As T_{REGS} são responsáveis pela manutenção de mecanismos “ativos” de supressão e imunorregulação que atuam em conjunto com os demais mecanismos da tolerância periférica. Diversos estudos têm sido realizados avaliando

o papel das T_{REGS} na manutenção da tolerância periférica e na fisiopatologia das doenças auto-imunes. Sua relevância nesse processo tem sido claramente demonstrada em modelos murinos, em que a ausência de T_{REGS} ou a depleção destas desencadeia doenças auto-imunes sistêmicas, com elevados títulos de anticorpos antinúcleo, bem como auto-anticorpos órgão-específicos⁽¹⁵⁾. Achados importantes, como defeitos funcionais, fenotípicos e de frequências de células regulatórias, têm sido relatados em várias doenças reumáticas auto-imunes humanas, evidenciando, assim, seu importante papel na manutenção da tolerância imunológica e nos mecanismos fisiopatológicos dessas enfermidades.

ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide (AR) é caracterizada como desordem inflamatória crônica que cursa principalmente com a destruição da arquitetura das articulações. Os eventos patogênicos que levam à AR ainda não são totalmente compreendidos, entretanto, a presença de citocinas inflamatórias tem sido muito bem documentada como fator-chave na indução e na manutenção da doença⁽⁴⁸⁾. O desequilíbrio entre populações de células regulatórias (como as células regulatórias naturais CD4⁺CD25⁺, TR1 e TH3) e células efectoras pró-inflamatórias (TH1 e TH17) tem-se mostrado de importância fundamental para o desenvolvimento e a persistência da doença. Estudos demonstram o papel das células T CD4⁺ juntamente com os macrófagos no processo de dano articular com ênfase para as suas subpopulações TH1 e TH17, implicadas no processo inflamatório e de erosão óssea da cartilagem⁽⁴⁹⁾.

Nesse contexto alguns estudos têm sido realizados com o propósito de avaliar o papel das T_{REGS} na AR. Ehrenstein *et al.*⁽⁵⁰⁾, avaliando os efeitos da terapia com infliximabe, observaram níveis aumentados de T_{REGS} no sangue periférico de pacientes com AR ativa, em comparação a controles saudáveis, evidenciando, ainda, aumento significativo em sua capacidade supressora. Outro estudo demonstrou que a frequência das T_{REGS} está aumentada no fluido sinovial de pacientes adultos, comparado com o sangue periférico de pacientes com AR. Não foi observada diferença significativa na frequência de T_{REGS} no sangue periférico de pacientes em relação a controles normais⁽⁵¹⁾.

Resultados discordantes foram encontrados no que diz respeito à proporção de T_{REGS} no sangue periférico, tendo sido relatada a observação de níveis aumentados no sangue periférico⁽⁵¹⁾ e no fluido sinovial^(52,53), além da demonstração de atividade supressora mais potente do que a observada

nas T_{REGS} periféricas⁽⁵²⁾. Em contrapartida, níveis normais de T_{REGS} no sangue periférico foram também detectados em algumas pesquisas⁽⁵³⁾. Essa variabilidade decorre, provavelmente, de diferenças no estágio da doença, terapia e certamente variações nas estratégias de caracterização das T_{REGS} ⁽⁵⁴⁾.

Em pesquisas mais recentes, Cao *et al.*^(55,56) observaram que, em cerca de 95% dos pacientes com doenças reumáticas que cursam com artrite, como AR, artrite reumatóide juvenil, espondilite anquilosante, lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença de Behçet, polimialgia reumática e doença mista do tecido conjuntivo, possuem níveis elevados de T_{REGS} na articulação inflamada, independentemente da condição clínica e do tempo de doença. Esses autores sugerem que as T_{REGS} , mesmo que aumentadas numericamente na sinóvia inflamada e com função supressora normal, são incapazes de suprimir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células T ativadas ou monócitos, possivelmente porque a ação supressora das T_{REGS} seria superada por células T com sinais de forte ativação presentes nesses locais, incluindo as células TH1 e as TH17⁽⁵⁰⁾, em conformidade com os dados apresentados por Nistala *et al.*⁽⁵⁷⁾ que demonstraram que o balanço entre as populações de T_{REGS} e TH17 correlacionam-se inversamente e são de grande importância na evolução da doença. A falência da função inibitória das T_{REGS} na AR foi sugerida também por van Amlsvoort *et al.*⁽⁵⁸⁾ que relataram níveis e atividade supressora de T_{REGS} aumentados na sinóvia de pacientes com AR quando comparados a mesma população do sangue periférico. Contudo, a inflamação persistia. Possivelmente, citocinas derivadas de monócitos, como TNF e IL-7, bem como moléculas co-estimulatórias, como CD28, sejam fatores que contrabalançam a supressão das T_{REGS} nesses pacientes, tanto no fluido sinovial quanto no sangue periférico impedindo a supressão⁽⁴⁸⁾.

LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O LES é considerado o protótipo das doenças auto-imunes, caracterizado pela produção de anticorpos auto-reativos contra constituintes próprios, por exemplo, os componentes do núcleo celular. É uma doença que cursa com as mais variadas manifestações clínicas e laboratoriais e sua etiologia exata ainda permanece obscura. Múltiplos defeitos no sistema imune desses pacientes têm sido documentados, como hiper-reatividade de células B, defeitos nos processos de ativação linfóide e produção aberrante de citocinas⁽⁵⁹⁾.

Em humanos, vários estudos foram realizados com o propósito de avaliar a frequência, o fenótipo e a função das T_{REGS} no sangue periférico de indivíduos com LES. Na primeira avaliação realizada por Crispin, Martinez e Alcocer-Varela⁽⁶⁰⁾, foi observada frequência de células $CD4^+CD25^+$ significativamente diminuída em pacientes com a doença ativa, quando comparado com os pacientes com a doença inativa e os controles normais. Posteriormente, Liu *et al.*⁽⁶¹⁾ obtiveram resultados semelhantes, contudo sem correlação significativa entre os níveis de T_{REGS} e a atividade da doença. Mais tarde, Lee *et al.*⁽⁶²⁾ demonstraram frequência diminuída de T_{REGS} no sangue periférico, e correlação inversa entre os níveis de T_{REGS} e os níveis de anticorpos anti-dsDNA. Miyara *et al.*⁽⁶³⁾ relataram ausência de diferenças fenotípicas e funcionais nas T_{REGS} de pacientes com LES e de indivíduos normais, mas confirmaram diminuição no número de T_{REGS} em pacientes com doença ativa quando comparados com os controles normais e com pacientes com doença inativa. O mesmo foi observado por Mellor-Pita *et al.*⁽⁶⁴⁾ quanto à diminuição na porcentagem de T_{REGS} no sangue periférico de pacientes com LES, tanto na fase ativa quanto na inativa. Foi relatado que a queda no nível dessa população celular é mais acentuada quanto maior for o grau de atividade da doença. Segundo os autores, essa diminuição não está relacionada ao uso de medicamentos imunossupressores, pois tanto os pacientes que estavam sobre tratamento quanto os que não estavam recebendo nenhum tipo de fármaco apresentaram queda equivalente no nível de T_{REGS} , quando comparados aos indivíduos controles⁽⁶⁴⁾. Foi demonstrado, também, redução na proporção de T_{REGS} nos tecidos de pacientes com lúpus cutâneo⁽⁶⁵⁾.

Estudos posteriores trouxeram resultados discordantes dos relatos de redução da frequência de T_{REGS} no LES, a partir da observação de números normais em pacientes lúpicos⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾, sobretudo ressaltando-se o efeito do tratamento com glicocorticóides na indução de aumento percentual dessas células^(66,69).

Concomitantemente, alguns autores apresentaram resultados de redução significativa na capacidade funcional de indução de supressão das T_{REGS} de pacientes com LES em atividade quando comparado com controles normais e com pacientes com LES inativo⁽⁷⁰⁾. Outro estudo apresentou evidências de anormalidades de células T regulatórias (T_{REGS} e TR1) em pacientes em atividade ou fora de atividade, tanto na fase de doença inativa quanto em pacientes clinicamente assintomáticos, ressaltando-se, novamente, que a terapia com corticosteróides e outros imunossupres-

sores pode prevenir o desenvolvimento de alterações mais significativas⁽⁷¹⁾.

Em um outro estudo, níveis reduzidos de T_{REGS} foram observados em pacientes recém-diagnosticados, livres de tratamento com imunossuppressores e níveis normais foram observados no grupo que recebia tratamento imunossupressor. A expressão de *FOXP3* e a capacidade de suprimir a proliferação de células T CD4 e T CD8 se mantiveram diminuídas em ambos os grupos, sugerindo que o tratamento apresenta efeito global sobre os números de T_{REGS} , mas não afeta sua capacidade funcional prejudicada⁽⁷²⁾. O efeito da terapia com glicocorticóides sobre as T_{REGS} foi também avaliado em estudo de dois anos de seguimento de um paciente lúpico recém-diagnosticado e livre de tratamento. A proporção de T_{REGS} antes do início da terapia (SLEDAI de 7) era semelhante à dos controles normais. Após o início do tratamento, a frequência de T_{REGS} apresentou substancial aumento. Em nova avaliação, após dois anos de seguimento com tratamento com glicocorticoide, a frequência se manteve elevada quando comparado aos controles normais, evidenciando, assim, o efeito positivo da corticoterapia sobre os níveis de T_{REGS} no sangue periférico⁽⁶⁹⁾.

Os estudos adicionais são contraditórios a partir dos relatos de que as T_{REGS} estão quantitativamente deficientes no LES^(73,74) em oposição aos relatos de que não há anormalidade numérica desta população celular na doença⁽⁷⁵⁾. As divergências também são observadas no que diz respeito à suposta presença de anormalidades na função das T_{REGS} , tendo sido também apresentados resultados favoráveis à não-existência de defeito imunorregulatório nesta população celular^(76,77). Em conjunto, a heterogeneidade de resultados sobre a biologia das T_{REGS} no LES ressaltam a necessidade de mais pesquisas para melhor compreensão do tema com a concomitante possibilidade de aplicação na clínica.

DOENÇA MISTA DO TECIDO CONJUNTIVO

A doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) é caracterizada como desordem inflamatória crônica que cursa com o acometimento de vários órgãos e apresenta manifestações clínicas variadas, em que características clínicas do LES, esclerose sistêmica e da polimiosite são sobrepostas em um mesmo indivíduo. Nessa enfermidade são observadas alterações imunológicas, como aumento nos níveis de TNF- α e IL-10, bem como a presença de auto-anticorpos contra U_1 RNP em altos níveis^(78,79). Sendo também relatados outros auto-anticorpos, como anti-U1-RNA e anticorpos

antinucleares⁽⁸⁰⁾. Tendo em vista as variadas alterações imunes observadas nessa doença, Barath *et al.*⁽⁸¹⁾ realizaram um estudo investigando o papel das T_{REGS} e de linfócitos TR1 na DMTC. Observaram que as T_{REGS} de pacientes com DMTC estavam diminuídas em comparação aos controles normais, enquanto as células TR1 estavam em níveis mais elevados nos pacientes com DMTC. De modo interessante, a diminuição das T_{REGS} e o aumento das células TR1 foram mais acentuados nos pacientes com maiores índices de atividade da doença. Os autores sugerem, nesse estudo, que o estado de inflamação crônica esteja associado ao aumento de produção de IL-6 e IL-10, citocinas importantes para suprimir a indução de T_{REGS} e levar a aumento de diferenciação de TR1, respectivamente^(82,83). Estudos adicionais sobre o papel das células imunorregulatórias e suas possíveis interações na DMTC são ainda necessários para melhor caracterização e compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa enfermidade.

SÍNDROME DE SJÖGREN

A síndrome de Sjögren primária (SSp) é uma desordem auto-imune caracterizada por infiltração linfocitária das glândulas salivares e lacrimais podendo levar a xerostomia e a xerofthalmia e, eventualmente, a manifestações extraglandulares. Sua prevalência varia de 0,2% a 0,5% na população geral. Um estudo realizado por Gottenberg *et al.*⁽⁸⁴⁾, demonstrou, de modo inesperado, que a frequência das T_{REGS} CD4⁺CD25⁺ estava elevada em pacientes com SSp e que a função supressora dessas células também se apresentou normal, quando comparado com os controles. Entretanto, os autores desse estudo fizeram toda a avaliação de T_{REGS} em populações de células submetidas a separação magnética por coluna, procedimento este que pode ter gerado amostra impura para análise, visto que células ativadas também apresentam alta expressão de CD25. Na ocasião desse estudo não foi realizada a marcação para *FOXP3*, uma vez que o anticorpo monoclonal ainda não estava disponível, o que dificulta a interpretação desses resultados⁽⁸⁴⁾. Em pesquisa posterior, realizada por Liu *et al.*⁽⁸⁵⁾, foi comprovada redução das T_{REGS} no sangue periférico de pacientes com SSp comparado a controles normais. Nesse estudo, foi avaliada a existência de correlação inversa entre os níveis de células CD4⁺CD25^{BRIGHT} e os marcadores inflamatórios e de função imune VHS, proteína C reativa, IgG e fator reumatóide. Com base nos resultados, foi sugerido que as T_{REGS} desempenham importante papel imunorregulatório na patogenia da SSp.

DOENÇA DE KAWASAKI

A doença de Kawasaki é uma desordem auto-imune que cursa com inflamação e danos aos vasos sanguíneos, podendo também levar ao acometimento de membranas mucosas, linfonodos e coração. É uma doença ainda pouco compreendida, que ocorre, predominantemente, em crianças. Um estudo realizado por Furuno *et al.*⁽⁸⁶⁾ caracterizou o envolvimento das T_{REGS} $CD4^+CD25^+$ na doença de Kawasaki⁽⁸⁶⁾. Pacientes na fase aguda da doença exibiram frequência diminuída de T_{REGS} $CD4^+CD25^+$ no sangue periférico quando comparados com os grupos-controles. Em adição, o nível de expressão do mRNA para FOXP3, GITR e CTLA-4 na população de células mononucleares (PBMC) também estava significativamente diminuído, sugerindo anormalidade funcional nas T_{REGS} e suscitando a hipótese de participação dessas células na fisiopatologia da doença.

GRANULOMATOSE DE WEGENER

A granulomatose de Wegener é uma síndrome clínico-patológica caracterizada, principalmente por inflamação granulomatosa extravascular e por vasculite granulomatosa, acometendo, em especial, vasos de pequeno calibre. Em um estudo recente, Abdulhad *et al.*⁽⁸⁷⁾ detectaram porcentagem aumentada de T_{REGS} $CD25^{high}$ FOXP3⁺ com fenótipo de memória em pacientes com granulomatose de Wegener em remissão. Entretanto, a função *in vitro* dessas células estava defeituosa, sugerindo haver proporção aumentada de T_{REGS} , embora com função comprometida. O estudo demonstrou que a função prejudicada não estava relacionada à resistência das células T respondedoras à imunossupressão, comprovado por experimentos de co-cultura de células T de pacientes com as de controles, nem por causa da sobrevivência diminuída das T_{REGS} ⁽⁸⁷⁾.

De maneira geral, ainda não está totalmente esclarecido se as T_{REGS} encontram-se realmente diminuídas nas enfermidades reumáticas, e dúvidas permanecem quanto a sua capacidade funcional. Os estudos são, muitas vezes, contraditórios, em parte em razão da heterogeneidade nos marcadores fenotípicos utilizados para a definição desta população em cada estudo. Com o advento do uso dos anticorpos monoclonais anti-Foxp3 e anti-CD127 para caracterização de células regulatórias naturais, aumentou-se muito a sensibilidade e a especificidade para identificação desta população. Portanto, espera-se que os estudos atualmente em curso devam elucidar com maior precisão o exato papel dessas células nas diferentes doenças. Na tentativa de caracterização do papel das T_{REGS} nas diferentes doenças de

origem multifatorial é fundamental que sejam levadas em consideração as possibilidades de defeito imune relacionado à quebra da tolerância decorrente do mal funcionamento das T_{REGS} , sem, contudo, descartar a possibilidade de diminuição da sensibilidade à supressão mediada por parte dos clones auto-reativos. Assim, pode-se estimar a possibilidade de que o aumento na frequência das T_{REGS} poderia ser encontrado em tentativa fracassada de contrabalançar a hiper-reatividade dos clones auto-reativos. Finalmente, é importante se ter em mente que cada doença reumática auto-imune apresenta considerável heterogeneidade clínica e fisiopatológica, assemelhando-se mais a síndromes do que a entidades nosológicas propriamente ditas. Portanto, não deverá ser surpresa o achado de alterações numéricas e/ou funcionais em apenas uma fração de pacientes com determinada doença reumática auto-imune, visto que nos demais os mecanismos fisiopatológicos determinantes podem ser outros.

APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DAS T_{REGS} EM DOENÇAS AUTO-IMUNES: PERSPECTIVAS FUTURAS

Estratégias de imunoterapia com base no uso de células T_{REGS} para tratar doenças auto-imunes representam nova oportunidade e novo desafio na imunologia moderna para controlar o processo inflamatório nessas doenças, abrindo possibilidades para a introdução de terapias mais eficazes e menos agressivas. As pesquisas em modelos animais evidenciam que as manipulações da função e do número de T_{REGS} possuem potencial terapêutico para induzir tolerância em pacientes com desordens auto-imunes⁽⁸⁸⁾. As potenciais vantagens da transferência adotiva de T_{REGS} sobre os tratamentos convencionais são numerosas. Alguns dos benefícios incluem: potencial para direcionamento da terapia conforme a especificidade antigênica evitando imunossupressão sistêmica; potencial de indução de imunorregulação fisiológica duradoura *in vivo* e a possibilidade de padronização de terapia individualizada, designada, especificamente, para cada paciente e com mínimos efeitos colaterais.

Não obstante os sucessos obtidos no tratamento de modelos murinos de doenças auto-imunes com a transferência de células T regulatórias, ainda não está claro se esses experimentos serão aplicáveis e trarão benefícios aos humanos. Alguns questionamentos incluem o subtipo de célula regulatória mais apropriado para a transferência adotiva em cada enfermidade e em cada paciente e qual o método de escolha para a expansão, de modo seguro e

eficiente das células regulatórias *ex vivo*. Alguns estudos clínicos de transferência adotiva já estão sendo realizados e, provavelmente, algumas dessas perguntas serão respondidas em breve⁽⁸⁹⁾.

Uma das dificuldades na elaboração das terapias imunorregulatórias com T_{REGS} é observada na especificidade que elas apresentam contra os auto-antígenos alvo. Linfócitos T regulatórios monoclonais expandidos *in vitro* reconhecem especificamente os auto-antígenos alvo e podem fornecer imunossupressão de maneira mais eficiente e segura⁽⁸⁹⁾. Como na maioria das doenças auto-imunes, o principal auto-antígeno alvo da resposta é desconhecido, torna-se difícil a manipulação e a produção de células regulatórias monoclonais, o que representaria alternativa mais atrativa por apresentar menos efeitos colaterais. No caso de serem utilizadas populações policlonais é evidente a possibilidade do desencadeamento de imunossupressão sistêmica, o que poderia levar a aumento no risco de desenvolvimento de doenças infecciosas e câncer⁽⁹⁰⁾. Além dessa dificuldade, mesmo embora os protocolos para expansão *in vitro* de células T_{REGS} humanas já estejam disponíveis, sua utilização em ensaios clínicos ainda é assunto problemático, pois envolve manipulação de material biológico e protocolo avançado de isolamento e proliferação celular, no qual as células precisam ser isoladas e expandidas sem perder sua capacidade imunossupressora. Como descrito em modelos pré-clínicos, a utilização de T_{REGS} policlonais pode prevenir ou melhorar o quadro das doenças auto-imunes, enquanto o uso apenas das T_{REGS} antígeno-específicas poderá levar à cura⁽⁹¹⁾. A Figura 6 apresenta a seqüência de eventos necessários na realização da terapia com células imunorregulatórias.

Muitos estudos têm demonstrado que em várias enfermidades, como na AR, por exemplo, essas células não estão em frequência diminuída, mas apresentam menor capacidade supressora, seja por defeito intrínseco ou em decorrência das condições inflamatórias hostis que impedem a sua ação. Nessas situações, a restauração de sua função supressora pode ser a alternativa mais atrativa. Citocinas com a IL-6, IL-1 e TNF- α são capazes de inibir a indução das células T_{REGS} na periferia e dificultam sua ação no sítio inflamatório. Desse modo, terapias visando ao bloqueio destas citocinas auxiliam o restabelecimento da ação regulatória destas células, evidência suportada pelo sucesso da terapia anti-TNF em vários pacientes com AR⁽⁴⁸⁾.

Em alguns estudos clínicos em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea têm havido grande atenção para a terapia com células T_{REGS} , visando a cura ou a redu-

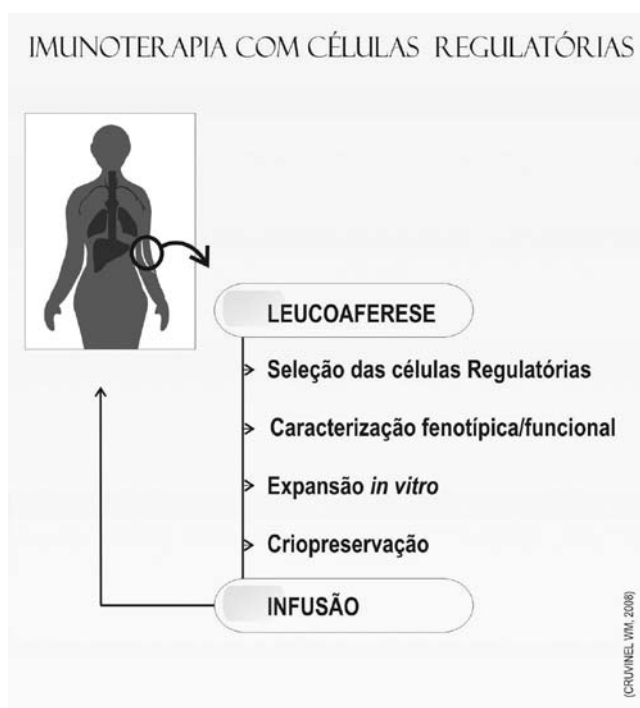


Figura 6 – Etapas da imunoterapia a partir das células imunoregulatórias.

ção da incidência da doença do enxerto *versus* hospedeiro. As T_{REGS} podem ser purificadas pela separação das células $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ e expandidas *in vitro*. As potenciais limitações da utilização de T_{REGS} é o seu número reduzido na circulação e sua especificidade antigênica ampla e ainda pouco definida. A outra população de células imunorregulatórias em estudo em pacientes transplantados são as células TR1, que possuem as vantagens de serem induzidas *ex vivo* e de facilmente serem geradas células antígeno-específicas. A maior limitação deste subtipo é a dificuldade de purificar essa população, uma vez que ainda não se conhecem marcadores de superfície específicos. Levando-se em consideração as evidências positivas da aplicação das terapias com células T_{REGS} no campo dos transplantes, são otimistas as possibilidades de expansão de tais estratégias para tratamento de enfermidades autoimunes⁽⁹¹⁾. Vários grupos estão desenvolvendo protocolos para a geração de T_{REGS} antígenos específicas. Arbour *et al.*⁽⁹²⁾ estão investigando a expansão de células T específicas para a mielina, isoladas de pacientes com esclerose múltipla como possível fonte para terapia celular. Outros estudos promissores de transferência de T_{REGS} monoclonais têm sido realizados com êxito em modelos experimentais de diabetes tipo 1^(93,94).

As perspectivas preliminares quanto à restauração dos mecanismos regulatórios nas enfermidades auto-imunes,

por intermédio da manipulação terapêutica de alvos celulares, são animadoras e otimistas. Intervenções fundamentadas na expansão das células regulatórias ou na otimização de suas funções supressoras são promessa tangível no sentido do desenvolvimento de terapias superiores com diferentes aspectos positivos. Entre esses, listam-se a possibilidade de se gerar resposta antiinflamatória antígeno-específica e não imunossupressora generalizada com conseqüências negativas ao paciente, a minimização de efeitos colaterais e o aumento da duração dos tratamentos. São concretas as dificuldades observadas, entre as quais

destacam-se as dificuldades metodológicas da manipulação celular com finalidade terapêutica, o alto custo dos procedimentos, a falta de informações e as dificuldades de transposição das experiências obtidas em modelos animais para humanos. Mesmo assim, as informações alcançadas nos últimos dez anos no campo da imunorregulação revolucionaram a compreensão dos mecanismos das enfermidades auto-imunes e abriram perspectivas para que os pesquisadores possam, além de apenas compreender os processos fisiopatológicos passar, gradativamente, a intervir neles em benefício dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- Lippolis JD: Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci* 86(14): 53-63, 2008.
- Janeway CA Jr: How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3(11): 67-71, 2001.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P: T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49(2): 273-80, 1987.
- Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP: Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol* 81(2): 435-40, 1983.
- Jiang H, Chess L: An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114(9): 1198-208, 2004.
- Papiernik M, Leite-de-Moraes MC, Pontoux C, et al.: T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J Immunol* 158(10): 4642-53, 1997.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H: Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3(8): 756-63, 2002.
- Bach JF: Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 16(7): 353-5, 1995.
- Pearson CI, McDevitt HO: Redirecting Th1 and Th2 responses in autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 238: 79-122, 1999.
- Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Delovitch TL: Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med* 80(5): 290-300, 2002.
- Hayday A, Tigelaar R: Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 3(3): 233-42, 2003.
- Ni Choileain N, Redmond HP: Regulatory T-cells and autoimmunity. *J Surg Res* 130(1): 124-35, 2006.
- Lu L, Werneck MB, Cantor H: The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol Rev* 212: 51-9, 2006.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK: Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 16(2): 219-30, 2002.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3): 1151-64, 1995.
- von Boehmer H: Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6(4): 338-44, 2005.
- Baecher-Allan CM, Hafler DA: Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clin Immunol* 117(2): 192. Discussion 193, 2005.
- Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101(5): 455-8, 2000.
- Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 18: 423-49, 2000.
- Sakaguchi S: Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62, 2004.
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM: The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148(1): 32-46, 2007.
- Demengeot J, Zelenay S, Moraes-Fontes MF, et al.: Regulatory T cells in microbial infection. *Springer Semin Immunopathol* 28(1): 41-50, 2006.
- Khazaie K, von Boehmer H: The impact of CD4+CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol* 16(2): 124-36, 2006.
- Fehervari Z, Sakaguchi S: CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 114(9): 1209-17, 2004.
- Gershon RK, Kondo K: Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18(5): 723-37, 1970.
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T: Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance. Deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161(1): 72-87, 1985.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167(3): 1245-53, 2001.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al.: Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in

- maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162(9): 5317-26, 1999.
29. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al.: Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2(4): 301-6, 2001.
30. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, et al.: Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4(8): 579-86, 2005.
31. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, et al.: Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 196(3): 379-87, 2002.
32. Taams LS, Smith J, Rustin MH, et al.: Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 31(4): 1122-31, 2001.
33. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al.: Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 106(2): 190-9, 2002.
34. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, et al.: Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 196(10): 1335-46, 2002.
35. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609): 1057-61, 2003.
36. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4): 330-6, 2003.
37. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al.: Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203(7): 1693-700, 2006.
38. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al.: Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22(3): 329-41, 2005.
39. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al.: CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203(7): 1701-11, 2006.
40. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, et al.: Ex vivo isolation and characterization of CD4 (+) CD25 (+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193(11): 1303-10, 2001.
41. Thornton AM, Shevach EM: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188(2): 287-96, 1998.
42. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10(12): 1969-80, 1998.
43. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, et al.: Human CD4 (+) CD25 (+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 196(2): 247-53, 2002.
44. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM: Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172(11): 6519-23, 2004.
45. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, et al.: CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8(12): 1353-62, 2007.
46. Paust S, Cantor H: Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 204: 195-207, 2005.
47. Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S: Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol* 81(1): 161-7, 2007.
48. Schett G: Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. *Autoimmunity* 41(3): 224-9, 2008.
49. Miossec P: Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis Rheum* 56: 2111-5, 2007.
50. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al.: Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200(3): 277-85, 2004.
51. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, et al.: CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 140(2): 360-7, 2005.
52. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, et al.: CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50(9): 2775-85, 2004.
53. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al.: Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33(1): 215-23, 2003.
54. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, et al.: Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2008.
55. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al.: CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 6(4): R335-46, 2004.
56. Cao D, Borjesson O, Larsson P, et al.: FOXP3 identifies regulatory CD25bright CD4+ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol* 63(6): 444-52, 2006.
57. Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, et al.: Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* 58(3): 875-87, 2008.
58. van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, et al.: Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56(3): 732-42, 2007.
59. Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA: Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 59(4): 243-51, 2000.
60. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J: Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21(3): 273-6, 2003.
61. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR: Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 59(2): 198-202, 2004.
62. Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang YH, Lin DT, Chiang BL: Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population

- and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 117(2): 280-6, 2006.
63. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al.: Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175(12): 8392-400, 2005.
 64. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, et al.: Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65(4): 553-4, 2006.
 65. Franz B, Fritzsche B, Riehl A, et al.: Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56(6): 1910-20, 2007.
 66. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C: Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 65(11): 1512-7, 2006.
 67. Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, et al.: Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 27(2): 110-8, 2006.
 68. Tsutsumi Y, Jie X, Ihara K, et al.: Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with Type 1 diabetes. *Diabet Med* 23(10): 1145-50, 2006.
 69. Cepika AM, Marinic I, Morovic-Vergles J, et al.: Effect of steroids on the frequency of regulatory T cells and expression of FOXP3 in a patient with systemic lupus erythematosus: a two-year follow-up. *Lupus* 16(5): 374-7, 2007.
 70. Valencia X, Lipsky PE: CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3(11): 619-26, 2007.
 71. Barath S, Aleksza M, Tarr T, et al.: Measurement of natural (CD4+CD25high) and inducible (CD4+IL-10+) regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 16(7): 489-96, 2007.
 72. Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, et al.: Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 601: 113-9, 2007.
 73. Bonelli M, Savitskaya A, von Dalwigk K, et al.: Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int Immunol* 20(7): 861-8, 2008.
 74. Lee HY, Hong YK, Yun HJ, et al.: Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47(6): 789-94, 2008.
 75. Yan B, Ye S, Chen G, et al.: Dysfunctional CD4+,CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum* 58(3): 801-12, 2008.
 76. Chowdhary Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, et al.: Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25(high),CD127(-/low) regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 58(7): 2120-30, 2008.
 77. Vargas-Rojas MI, Crispin JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J: Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 17(4): 289-94, 2008.
 78. Bodolay E, Aleksza M, Antal-Szalmas P, et al.: Serum cytokine levels and type 1 and type 2 intracellular T cell cytokine profiles in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 29(10): 2136-42, 2002.
 79. Alarcon-Segovia D, Villarreal M: Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. In: Kasukawa R, Sharp GC, editores. *Mixed connective tissue diseases and antinuclear antibodies*, Amsterdam: Elsevier, 41-7, 1987.
 80. Hoffman RW, Maldonado ME: Immune pathogenesis of mixed connective tissue disease: a short analytical review. *Clin Immunol* 128(1): 8-17, 2008.
 81. Barath S, Sipka S, Aleksza M, Szegedi A, Szodoray P, Vegh J, et al.: Regulatory T cells in peripheral blood of patients with mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 35(4): 300-4, 2006.
 82. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, et al.: The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 115(2): 313-25, 2005.
 83. Nishimaki T, Aotsuka S, Kondo H, et al.: Immunological analysis of pulmonary hypertension in connective tissue diseases. *J Rheumatol* 26(11): 2357-62, 1999.
 84. Gottenberg JE, Lavie F, Abbed K, et al.: CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 24(3): 235-42, 2005.
 85. Liu MF, Lin LH, Weng CT, Weng MY: Decreased CD4+CD25+bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Lupus* 17(1):34-9, 2008.
 86. Furuno K, Yuge T, Kusuha K, et al.: CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 145(3): 385-90, 2004.
 87. Abdulahad WH, Stegeman CA, van der Geld YM, et al.: Functional defect of circulating regulatory CD4+ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 56(6): 2080-91, 2007.
 88. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, et al.: CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48(5): 1452-60, 2003.
 89. Roncarolo MG, Battaglia M: Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 7(8): 585-98, 2007.
 90. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, et al.: CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199(11): 1467-77, 2004.
 91. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA: Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 223: 371-90, 2008.
 92. Arbour N, Lapointe R, Saikali P, et al.: A new clinically relevant approach to expand myelin specific T cells. *J Immunol Methods* 310(1-2): 53-61, 2006.
 93. Filippi C, Bresson D, von Herrath M: Antigen-specific induction of regulatory T cells for type 1 diabetes therapy. *Int Rev Immunol* 24(5-6): 341-60. Review. 2005.
 94. Tarbell KV, Petit L, Zuo X, et al.: Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 204(1): 191-201, 2007.